

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
30. September 2004 (30.09.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/082814 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **B01F**

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/002977

(22) Internationales Anmeldedatum:
22. März 2004 (22.03.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
103 12 628.7 21. März 2003 (21.03.2003) DE

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): FRIZ BIOCHEM GMBH [DE/DE]; Staffelseestrasse 6, 81477 München (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): HARTWICH, Gerhard [DE/DE]; Niebelungenstrasse 10, 80639 München

(DE). FRISCHMANN, Peter [DE/DE]; Marsopstrasse 6c, 82145 München (DE). WIEDER, Herbert [DE/DE]; Partnachstrasse 3, 81373 München (DE). KRATZMÜLLER, Thomas [DE/DE]; Reutbergstrasse 20, 81371 München (DE). PERSIKE, Norbert [DE/DE]; Hanselmannstr. 15, 80809 München (DE).

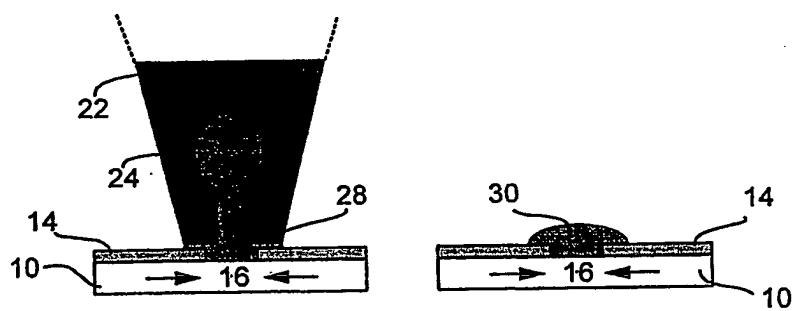
(74) Anwalt: SCHWARZENSTEINER, Marie-Louise; Sebastianplatz 7, 80331 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR WETTING A SUBSTRATE WITH A LIQUID

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUM BENETZEN EINES SUBSTRATS MIT EINER FLÜSSIGKEIT



WO 2004/082814 A2

(57) Abstract: The invention relates to a method for wetting a substrate with a liquid, said method comprising the following steps: a) a substrate with a surface to be wetted is provided; b) a wetting liquid is provided; c) a protective layer is applied to the substrate, separating the surface to be wetted from the environment; d) the protective layer is structured in order to expose pre-determined wetting areas on the surface of the substrate to be wetted; and e) the wetting liquid is applied to the exposed wetting areas by means of a wetting device without any direct contact between the wetting device and the surface of the substrate to be wetted. The invention also relates to one such mass-produced substrate.

(57) Zusammenfassung: Ein Verfahren zum Benetzen eines Substrats mit einer Flüssigkeit umfasst die Verfahrensschritte a) Bereitstellen eines Substrats mit einer zu benetzenden Oberfläche; b) Bereitstellen einer Benetzungsflüssigkeit; c) Aufbringen einer Schutzschicht auf das Substrat, die die zu benetzende Oberfläche von der Umgebung trennt; d) Strukturieren der Schutzschicht, um vorbestimmte Benetzungsgebiete auf der zu benetzenden Oberfläche des Substrats freizulegen; und e) Aufbringen der Benetzungsflüssigkeit auf die freigelegten Benetzungsgebiete mittels einer Benetzungsvorrichtung ohne direkten Kontakt zwischen der Benetzungsvorrichtung und der zu benetzenden Oberfläche des Substrats. Die Erfindung enthält auch ein solcher massenherstellbares Substrat.



- (84) Bestimmungsstaaten (*soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

**Verfahren und Vorrichtung zum Benetzen eines Substrats
mit einer Flüssigkeit**

5

Technisches Gebiet

- 10 Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zum Benetzen eines Substrats mit einer Flüssigkeit, sowie ein mit dem erfindungsgemäßen Verfahren herstellbares flüssigkeitsbenetztes Substrat.

15

Stand der Technik

- Das Benetzen eines Substrats mit einer Flüssigkeit hat breite Anwendung in Industrie und Wissenschaft. Speziell im Bereich der Mikrostrukturierung von Oberflächen für die Biowissenschaften, die Medizintechnik und die Sensorik 20 erlangten in den letzten Jahren neben den klassischen lithographischen Methoden zusätzlich Benetzungsverfahren zunehmend an Bedeutung.

- 25 Diese Benetzungsverfahren zur lateralen Strukturierung von Oberflächen lassen sich grob in zwei Klassen unterteilen: Verfahren mit direktem Kontakt der Benetzungsvorrichtung mit dem Substrat, und Verfahren ohne direkten Kontakt.

- Bei den Strukturierungsverfahren mit direktem Kontakt ist besonders das Mikrokontakt-Drucken µCP (mico-contact-printing) hervorzuheben, das erstmals 30 von Whitesides 1994 (A. Kumar, G.M. Whitesides, Science, 1994, 263, 60; US-A-6 048 623) vorgestellt wurde. Bei diesem Verfahren wird ein mikrostrukturierter Stempel mit einer Flüssigkeit benetzt, anschließend in Kontakt mit dem zu bearbeitenden Substrat gebracht und so der Oberfläche

- 2 -

dem zu bearbeitenden Substrat gebracht und so der Oberfläche eine laterale chemische Struktur aufgeprägt. Eine große Schwierigkeit dieser Technik ist die Realisierung eines gleichförmigen Kontakts zwischen Stempel und Substrat, der für das Gelingen bzw. die Qualität von entscheidender Bedeutung
5 ist.

Neben diesen strukturierten Stempeln gibt es im Stand der Technik verschiedene Vorrichtungen zum Platzieren von Flüssigkeitstropfen auf ein Substrat, wie Nadeln, Kapillaren, Ringe oder Pinzetten, die hauptsächlich als Modifikationen des Druckens von Tinte auf Papier entstanden sind. Hierbei wird die Vorrichtung in die zu übertragende Flüssigkeit getaucht, so dass sich Material überträgt. Dieses Material wird mit der Vorrichtung auf dem Substrat platziert und bildet einen benetzten Bereich, der von den Oberflächenenergien der Vorrichtung, der Flüssigkeit und des Substrates abhängt. Das übertragene Volumen hängt bei diesen Verfahren in erster Linie von dem Durchmesser der Spitze der Vorrichtung ab. Probleme dieser Druckverfahren sind Variationen im übertragenem Flüssigkeitsvolumen und die Notwendigkeit, die Spitze mit dem Substrat für den Übertrag in physikalischen Kontakt zu bringen, was die Oberfläche des Substrats beschädigen kann.
10
15

Als Verfahren zum Übertrag von Flüssigkeiten auf ein Substrat, die ohne direkten Kontakt von Apparatur und Substrat auskommen, sollen hier beispielhaft die Ink-Jet Druckverfahren erwähnt werden. Bei diesen Techniken wird die Flüssigkeit im Druckkopf aufgenommen und dieser über der gewünschten Stelle des Substrats positioniert. Durch einen piezoelektrischen Kristall oder eine Pumpe wird auf die Flüssigkeit eine Kraft ausgeübt, so dass ein Tropfen den Kontaktkopf verlässt und auf das Substrat übertragen wird.
20
25

Auch bei den kontaktfreien Methoden ist die Größe des benetzten Bereichs durch die Oberflächenenergien der beteiligten Materialien bestimmt. Der durch den Kontaktwinkel zwischen Flüssigkeit und Substrat definierte Gleichgewichtszustand des Tropfen ist in hohem Grade abhängig von Faktoren wie
30

- 3 -

- Oberflächenrauhigkeit, chemischen Inhomogenitäten des Materials, Variationen der umgebenden Atmosphäre und natürlich Verunreinigungen. In einem realen System werden also die übertragenen Tropfen auf einem makroskopischen Substrat sehr unterschiedlich benetzen. Den Verfahren aus dem Stand der Technik sind also hinsichtlich der Toleranzen in Spotgrößen und Benetzungs volumina fundamentale Grenzen gesetzt.
- 5

Darstellung der Erfindung

10

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es deshalb, ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Benetzung von Substraten mit einer Flüssigkeit zu schaffen, welche die Nachteile des Standes der Technik nicht aufweisen.

- 15 Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch das Verfahren nach Anspruch 1, die Vorrichtung nach Anspruch 38 und das flüssigkeitsbenetzte Substrat nach Anspruch 40 gelöst. Weitere vorteilhafte Details, Aspekte und Ausgestaltungen der vorliegenden Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen, der Beschreibung, den Figuren und den Beispielen.

20

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden die folgenden Abkürzungen und Begriffe benutzt:

Allgemeines

µCP	Micro-Contact-Printing.
AFM	Atomic-Force-Microscope.
Analytflüssigkeit	Flüssigkeit, die potentiell einen Analyten enthält, der über einen Sensor nachgewiesen werden soll.
Flüssigkeit	nicht nur reine flüssige Stoffe, sondern auch Flüssigkeiten mit De-

	tergenz; jede Art von gelösten organischen oder anorganischen Stoffen, sowie Emulsionen, Suspensionen und kolloidalen Lösungen.
Laser-Ablation	partielles oder vollständiges Entfernen von organischen oder anorganischen Schutzschichten, aber auch das Entfernen von Verunreinigungen auf einem Substrat durch Einstrahlung von Laserlicht.
Lötstopplack	aus der Leiterplattentechnologie bekannter Lack, der auf Platinen aufgebracht wird, um beim automatisierten Löten das Entstehen von Lötzinnbrücken zu verhindern.
Pseudo-Kontakt-Drucken	Aufbringen einer Flüssigkeit mit Hilfe einer Nadel, Kapillare, Pinzette, eines Ringes oder Stempels bzw. einer Anordnung von Nadeln, Kapillaren, Pinzetten, Ringen oder Stempeln auf ein strukturiertes Substrat, wobei hier wegen der vorhandenen Schutzschicht und der lateralen Ausdehnung der Spitzen der Benetzungsvorrichtung, die bevorzugt größer als die freien zu benetzenden Flächen ist, kein direkter Kontakt zwischen der Benetzungsvorrichtung und dem Substrat zustande kommt.
Schutzschicht	auf das zu bearbeitende Substrat vor der eigentlichen Benetzung aufgebrachte Schicht. Hierfür ist jedes beliebige Material verwendbar, das an der Substratoberfläche eine geschlossene Schicht bildet und diese somit von der Umgebung trennt und zu einem späteren Zeitpunkt durch Laser-Ablation partiell und rückstandsfrei entfernt werden kann. Diese Schutzschicht kann aus organischen wie auch aus anorganischen Materialien bestehen und je nach Substrattyp und Anwendungsvoraussetzungen physisorbiert, chemisorbiert oder kovalent gebunden sein und mit beliebigen Techniken aufgebracht werden.
SEM	Scanning electron microscopy
Substrat	Festkörper mit einer frei zugänglichen Oberfläche, der somit mit

einer Flüssigkeit benetzt werden kann. Als Festkörpersubstrate kommen sowohl Kunststoffe, als auch Metalle, Halbleiter, Gläser, Verbundstoffe oder poröse Materialien in Frage. Die Bezeichnung Oberfläche ist unabhängig von den räumlichen Dimensionen der Oberfläche und beinhaltet auch Nanopartikel (Partikel oder Cluster aus wenigen einzelnen bis mehreren hunderttausend Oberflächen-Atomen oder -Molekülen).

UV	Ultraviolettes Licht
----	----------------------

Genetik

DNA	Desoxyribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
PNA	Peptidnukleinsäure (synthetische DNA oder RNA, bei der die Zucker-Phosphat Einheit durch eine Aminosäure ersetzt ist. Bei Ersatz der Zucker-Phosphat Einheit durch die -NH-(CH ₂) ₂ -N(COCH ₂ -Base)-CH ₂ CO- Einheit hybridisiert PNA mit DNA).
A	Adenin
G	Guanin
C	Cytosin
T	Thymin
Base	A, G, T, oder C
Bp	Basenpaar
Nukleinsäure	wenigstens zwei kovalent verbundene Nukleotide oder weniger-tens zwei kovalent verbundene Pyrimidin- (z. B. Cytosin, Thymin oder Uracil) oder Purin-Basen (z. B. Adenin oder Guanin). Der Begriff Nukleinsäure bezieht sich auf ein beliebiges "Rückgrat" der kovalent verbundenen Pyrimidin- oder Purin-Basen, wie z. B. auf das Zucker-Phosphat Rückgrat der DNA, cDNA oder RNA,

- 6 -

	auf ein Peptid-Rückgrat der PNA oder auf analoge Strukturen (z. B. Phosphoramid-, Thio-Phosphat- oder Dithio-Phosphat-Rückgrat). Wesentliches Merkmal einer Nukleinsäure im Sinne der vorliegenden Erfindung ist, dass sie natürlich vorkommende cDNA oder RNA sequenzspezifisch binden kann.
Nukleinsäure-Oligomer	Nukleinsäure nicht näher spezifizierter Basenlänge (z. B. Nukleinsäure-Oktamer: eine Nukleinsäure mit beliebigem Rückgrat, bei dem 8 Pyrimidin- oder Purin-Basen kovalent aneinander gebunden sind).
Oligomer	Äquivalent zu Nukleinsäure-Oligomer.
Oligonukleotid	Äquivalent zu Oligomer oder Nukleinsäure-Oligomer, also z. B. ein DNA, PNA oder RNA Fragment nicht näher spezifizierter Basenlänge.
Oligo	Abkürzung für Oligonukleotid.
ss	single strand (Einzelstrang)

Chemikalien

Alkyl	Der Begriff "Alkyl" bezeichnet ein gesättigtes Kohlenwasserstoffradikal, das geradkettig oder verzweigt ist (z.B. Ethyl, Isopropyl oder 2,5-Dimethylhexyl etc.). Wenn "Alkyl" benutzt wird, um auf einen Linker oder Spacer zu verweisen, bezeichnet der Begriff eine Gruppe mit zwei verfügbaren Valenzen für die kovalente Verknüpfung (z. B. -CH ₂ CH ₂ -,-CH ₂ CH ₂ CH ₂ - oder -CH ₂ C(CH ₃) ₂ CH ₂ CH ₂ C(CH ₃) ₂ CH ₂ - etc.).
Alkenyl	Alkylgruppen bei denen eine oder mehrere der C-C Einfachbindungen durch C=C Doppelbindungen ersetzt sind.
Alkinyl	Alkyl- oder Alkenylgruppen bei denen eine oder mehrere der C-C Einfach- oder C=C Doppelbindungen durch C≡C Dreifachbindungen ersetzt sind.
Hetero-Alkyl	Alkylgruppen bei denen eine oder mehrere der C-H Bindungen

	oder C-C Einfachbindungen durch C-N, C=N, C-P, C=P, C-O, C=O, C-S oder C=S Bindungen ersetzt sind.
Hetero-Alkenyl	Alkenylgruppen bei denen eine oder mehrere C-H Bindungen, C-C Einfach- oder C=C Doppelbindungen durch C-N, C=N, C-P, C=P, C-O, C=O, C-S oder C=S Bindungen ersetzt sind.
Hetero-Alkinyl	Alkinylgruppen bei denen eine oder mehrere der C-H Bindungen, C-C Einfach-, C=C Doppel- oder C≡C Dreifachbindung durch C-N, C=N, C-P, C=P, C-O, C=O, C-S oder C=S Bindungen ersetzt sind.
C18	Octadecanthiol
Fluorophor	chemische Verbindung (chemische Substanz), die in der Lage ist, bei Anregung mit Licht ein längerwelliges (rotverschobenes) Fluoreszenzlicht abzugeben. Fluorophore (Fluoreszenzfarbstoffe) können Licht in einem Wellenlängenbereich vom ultravioletten (UV) über den sichtbaren (VIS) bis hin zum infraroten (IR) Bereich absorbieren. Die Absorptions- und Emissionsmaxima sind typischerweise um 15 bis 40 nm gegeneinander verschoben (Stokes-Shift).
Ligand	Bezeichnung für Moleküle, die vom Ligaten spezifisch gebunden werden; Beispiele von Liganden im Sinne der vorliegenden Schrift sind Substrate, Cofaktoren oder Coenzyme eines Proteins (Enzyms), Antikörper (als Ligand eines Antigens), Antigene (als Ligand eines Antikörpers), Rezeptoren (als Ligand eines Hormons), Hormone (als Ligand eines Rezeptors) oder Nukleinsäure-Oligomere (als Ligand des komplementären Nukleinsäure-Oligomers).
Ligat	Bezeichnung für (Makro-) Molekül, an dem sich spezifische Erkennungs- und Bindungsstellen für die Ausbildung eines Komplexes mit einem Liganden befinden (Template).
Fluorescein	Resorcinphthalein

R	beliebiger, nicht näher spezifizierter organischer Rest als Substituent oder Seitenkette.
Amine	Moleküle der allgemeinen Struktur H ₂ N-Spacer-R
Silane	Moleküle der allgemeinen Struktur X ₃ -Si -Spacer-R, wobei z.B. X = H, Cl, OCH ₃
Thiole	Moleküle der allgemeinen Struktur HS -Spacer-R oder [SSpacer-R] ₂
Spacer	Beliebige molekulare Verbindung zwischen zwei Molekülen bzw. zwischen einem Oberflächenatom, Oberflächenmolekül oder einer Oberflächenmolekülgruppe und einem anderen Molekül, in der Regel Alkyl-, Alkenyl, Alkinyl-, Heteroalkyl-, Heteroalkenyl-, Heteroalkinyl-Ketten. Bevorzugte Spacer sind solche der Kettenlänge 1 - 20, insbesondere der Kettenlänge 1 - 14, wobei die Kettenlänge die kürzeste durchgehende Verbindung zwischen den zu verbindenden Strukturen darstellt.
Au-S-(CH ₂) ₂ -ss-Oligo-Fluorescein.	Gold-Oberfläche mit kovalent aufgebrachter Monolayer aus derivatisiertem Einzelstrang-Oligonukleotid. Hierbei ist die endständige Phosphatgruppe des Oligonukleotids am 3' Ende mit (HO-(CH ₂) ₂ -S) ₂ zum P-O-(CH ₂) ₂ -S-S-(CH ₂) ₂ -OH verestert, wobei die S-S Bindung homolytisch gespalten wird und je eine Au-S-R Bindung bewirkt. Am freien Ende trägt das Sonden-Oligonukleotid einen kovalent angebundenen Fluorophor Fluorescein.
Oligo-Spacer-S-Spacer-Oligo	zwei gleiche oder verschiedene Nukleinsäure-Oligomere, die über eine Disulfid-Brücke miteinander verbunden sind, wobei die Disulfidbrücke über zwei beliebige Spacer an die Nukleinsäure-Oligomere angebunden ist und die beiden Spacer eine unterschiedliche Kettenlänge (kürzeste durchgehende Verbindung zwischen Disulfidbrücke und dem jeweiligen Nukleinsäure-Oligomer) aufweisen können, insbesondere jeweils eine beliebige Kettenlänge zwischen 1 und 14 und diese Spacer wiederum an verschiedene natürlich am Nukleinsäure-Oligomer vorhandene

	ne oder an diese durch Modifikation angebrachte reaktive Gruppen gebunden sein können.
(n x HS-Spacer)-oligo	Nukleinsäure-Oligomer, an das n Thiolfunktionen über jeweils einen Spacer angebunden sind, wobei die Spacer jeweils eine unterschiedliche Kettenlänge (kürzeste durchgehende Verbindung zwischen Thiolfunktion und Nukleinsäure-Oligomer) aufweisen können, insbesondere jeweils eine beliebige Kettenlänge zwischen 1 und 14. Diese Spacer können wiederum an verschiedene natürlich am Nukleinsäure-Oligomer vorhandene oder an diesem durch Modifikation angebrachte reaktive Gruppen gebunden sein und "n" ist eine beliebige ganze Zahl, insbesondere eine Zahl zwischen 1 und 20.
(n x R-S-S-Spacer)-oligo	Nukleinsäure-Oligomer, an das n Disulfidfunktionen über jeweils einen Spacer angebunden sind, wobei ein beliebiger Rest R die Disulfidfunktion absättigt. Der Spacer zur Anbindung der Disulfidfunktion an das Nukleinsäure-Oligomer kann jeweils eine unterschiedliche Kettenlänge (kürzeste durchgehende Verbindung zwischen Disulfidfunktion und Nukleinsäure-Oligomer) aufweisen, insbesondere jeweils eine beliebige Kettenlänge zwischen 1 und 14. Diese Spacer können wiederum an verschiedene natürlich am Nukleinsäure-Oligomer vorhandene oder an diesem durch Modifikation angebrachte reaktive Gruppen gebunden sein. Der Platzhalter "n" ist eine beliebige ganze Zahl, insbesondere eine Zahl zwischen 1 und 20.

Erfindungsgemäß umfasst ein Verfahren zum Benetzen eines Substrats mit einer Flüssigkeit die folgenden Verfahrensschritte:

- a) Bereitstellen eines Substrats mit einer zu benetzenden Oberfläche;
- 5 b) Bereitstellen einer Benetzungsflüssigkeit;
- c) Aufbringen einer Schutzschicht auf das Substrat, die die zu benetzende Oberfläche von der Umgebung trennt;

10 -

- d) Strukturieren der Schutzschicht, um vorbestimmte Benetzungsgebiete auf der zu benetzenden Oberfläche des Substrats freizulegen; und
- e) Aufbringen der Benetzungsflüssigkeit auf die freigelegten Benetzungsgebiete mittels einer Benetzungsvorrichtung ohne direkten Kontakt zwischen der Benetzungsvorrichtung und der zu benetzenden Oberfläche des Substrats.

Durch die erfindungsgemäße Vorgehensweise werden Verunreinigungen der Benetzungsgebiete weitgehend ausgeschlossen und der Verschleiß der Benetzungsvorrichtung minimiert. Zugleich können durch die Strukturierung der Schutzschicht die zu benetzenden Gebiete auf dem Substrat in einfacher Weise vorgegeben werden. Das geometrische Zusammenspiel der Größe der Benetzungsvorrichtung, der lateralen Abmessungen der Benetzungsgebiete und der Dicke der an die Benetzungsgebiete angrenzenden Schutzschicht ermöglicht eine wohldefinierte Abgabe der Benetzungsflüssigkeit von der Benetzungsvorrichtung an die Oberfläche des Substrats.

Als Substrat wird dabei mit Vorteil ein Festkörper aus Kunststoff, Metall, Halbleiter, Glas, Verbundstoff, porösem Material oder aus einer Kombination dieser Materialien bereitgestellt. Insbesondere wird als Substrat bevorzugt ein Festkörper bereitgestellt, dessen zu benetzende Oberfläche durch eine Silizium-, Platin- oder Goldschicht bzw. eine oxidische Schicht oder ein Glas gebildet ist.

Die räumliche Gestaltung des Substrats ist nach der Erfindung nicht eingeschränkt. Vielmehr kann als Substrat beispielsweise eine makroskopische Festkörperscheibe, ein Mikro- oder Nanopartikel bereitgestellt werden.

Der Begriff "Benetzungsflüssigkeit" umfasst im Rahmen der vorliegenden Erfindung insbesondere rein flüssige Stoffe, Lösungen organischer und/oder anorganischer Stoffe, Emulsionen, Suspensionen oder kolloidale Lösungen.

- Das Material der Schutzschicht wird zweckmäßig so auf das Substratmaterial abgestimmt, dass das Schutzschichtmaterial auf der zu benetzenden Substratoberfläche physisorbiert, chemisorbiert oder kovalent, koordinativ oder über Komplexbildung gebunden ist. Beispielsweise kann als Schutzschicht ein
- 5 positiver oder negativer Photolack auf das Substrat aufgebracht, bevorzugt aufgesprüht oder aufgeschleudert werden. Ebenso kann als Schutzschicht für das Substrat ein Lötstopplack verwendet werden. Dabei ist bevorzugt, dass der Lötstopplack durch Siebdruck, Vorhanggießen oder ein Sprayverfahren aufgebracht wird.
- 10 Nach einer weiteren Verfahrensvariante wird als Schutzschicht ein organisches Polymer, insbesondere aus Cellulose, Dextran oder Collagen auf das Substrat aufgebracht. Das organische Polymer wird bevorzugt aufgeschleudert oder physisorbiert.
- 15 Nach noch einer weiteren vorteilhaften Variante wird als Schutzschicht eine selbstassemblierte Monolage aus organischen Molekülen aufgebracht. Diese wird insbesondere dadurch hergestellt, dass die organischen Moleküle in einem wässrigen oder organischen Lösungsmittel gelöst werden und die Lösung
- 20 in Kontakt mit dem Substrat gebracht wird.
- Eine besonders bevorzugte Ausgestaltung ergibt sich, wenn als Substrat mit Vorteil ein Festkörper bereitgestellt wird, dessen zu benetzende Oberfläche durch eine Goldschicht gebildet ist und wenn als Schutzschicht eine selbstassemblierte Monolage aus Thiolen, insbesondere der allgemeinen Struktur HS-
25 Spacer-R oder [S-Spacer-R]₂ aufgebracht wird. Dabei stellt R eine beliebige Kopfgruppe dar und der Spacer hat eine Kettenlänge von 1 – 20, insbesondere von 1 – 14.
- 30 Eine andere besonders bevorzugte Ausgestaltung ergibt sich, wenn als Substrat ein Festkörper bereitgestellt wird, dessen zu benetzende Oberfläche durch eine Silizium- oder Platinschicht gebildet ist, und wenn als Schutzschicht

- 12 -

eine selbstassemblierte Monolage aus Aminen, insbesondere der allgemeinen Struktur H₂N-Spacer-R aufgebracht wird. Auch hier stellt R eine beliebige Kopfgruppe dar und der Spacer hat eine Kettenlänge von 1 – 20, insbesondere von 1 – 14.

5

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausgestaltung wird als Substrat ein Festkörper bereitgestellt, dessen zu benetzende Oberfläche durch eine oxidische Oberfläche oder ein Glas gebildet ist. Als Schutzschicht wird dabei eine selbstassemblierte Monolage aus Silanen, insbesondere der allgemeinen

10 Struktur X₃-Si-Spacer-R aufgebracht, wobei R eine beliebige Kopfgruppe und X = H, Cl oder OCH₃ ist und der Spacer eine Kettenlänge von 1 – 20, insbesondere von 1 – 14 hat.

In allen drei genannten Verfahrensvarianten ist die Kopfgruppe R zweckmäßig
15 ausgewählt aus der Gruppe CH₃, OH, CO₂H, NH₂, NH₃⁺ oder SO₃⁻.

Die Schutzschicht wird in Schritt c) mit Vorteil in Form einer geschlossenen Schicht auf die zu benetzenden Substratoberflächen aufgebracht. Sie kann dabei sowohl vollflächig auf die gesamte Oberfläche des Substrats aufgebracht werden, oder nur Teilbereiche der Oberfläche bedecken. Im Bereich
20 der gewünschten Benetzungsgebiete wird die Schutzschicht anschließend zweckmäßig rückstandslos entfernt.

Die Strukturierung der Schutzschicht erfolgt in einer bevorzugten Ausgestaltung mittels Laserablation, insbesondere durch Bestrahlung von Teilbereichen der Schutzschicht mit kontinuierlicher oder gepulster Laserstrahlung einer vorbestimmten Wellenlänge. Die Schutzschicht wird dazu insbesondere direkt, über eine Optik oder über eine Maske mit der Laserstrahlung beaufschlagt, um die Benetzungsgebiete freizulegen.
25

30

Es hat sich als vorteilhaft herausgestellt, wenn durch die Laserstrahlung die zu benetzende Oberfläche des Substrats im Bereich der Benetzungsgebiete auf-

geschmolzen wird. Dadurch ergibt sich eine reduzierte Oberflächenrauhigkeit und eine verbesserte Homogenität der Oberfläche des Substrats. Außerdem werden durch die Ablation weniger Goldlagen von der Oberfläche Verunreinigungen entfernt.

5

Die Benetzungsgebiete werden vorteilhaft mit einer charakteristischen Ausdehnung von etwa 5 µm bis etwa 200 µm, bevorzugt von etwa 10 µm bis etwa 100 µm erzeugt. Als lateraler Abstand wird ein Wert von etwa 20 µm bis etwa 500 µm, bevorzugt von etwa 50 µm bis etwa 200 µm eingestellt. Die Benetzungsgebiete weisen vorteilhaft einen im wesentlichen rechteckigen, elliptischen oder kreisförmigen Umriss auf.

10
15

Nach einer vorteilhaften Weiterbildung der Erfindung werden bei dem Schritt d) zusätzlich Zuleitungskanäle in die Schutzschicht eingebracht, um die Zuführung einer Analytflüssigkeit zu den freigelegten Benetzungsgebieten zu ermöglichen.

20

Dabei werden die Zuleitungskanäle zweckmäßig mit einer Tiefe von 10% bis 99%, bevorzugt von 20% bis 95%, besonders bevorzugt von 50% bis 95% der Dicke der Schutzschicht in die Schutzschicht eingebracht. Die freigelegten Benetzungsgebiete sind dabei mit Vorteil innerhalb der Zuleitungskanäle angeordnet.

25

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren umfasst die Benetzungsanordnung insbesondere eine einzelne Nadel, Kapillare, Pinzette, einen einzelnen Ring oder Stempel. Sie kann im Rahmen der Erfindung auch eine Anordnung mehrerer Nadeln, Kapillaren, Pinzetten, Ringen, Stempeln, oder eine Anordnung verschiedener dieser Elemente umfassen.

30

Nach einer zweckmäßigen Ausgestaltung weist die Benetzungsanordnung eine flüssigkeitsabgebende Endfläche auf, deren laterale Ausdehnung in zumindest einer Raumrichtung größer ist, als die laterale Ausdehnung der Be-

- 14 -

netzungsgebiete in dieser Raumrichtung. Dadurch kann bei korrekter Ausrichtung ein direkter Kontakt zwischen der Benetzungs vorrichtung und der Oberfläche des Substrats vermieden werden.

- 5 Vorteilhaft weist die Endfläche der Benetzungs vorrichtung in beiden Raumrichtungen eine größere laterale Ausdehnung als die Benetzungsgebiete auf, so dass ein direkter Kontakt zwischen der Benetzungs vorrichtung und den Benetzungsgebieten in allen relativen Orientierungen vermieden wird.
- 10 Zum Aufbringen der Benetzungs flüssigkeit wird bevorzugt die Endfläche der Benetzungs vorrichtung in Kontakt mit der an das Benetzungs gebiet angrenzenden Schutzschicht gebracht. Ein Tropfen der Benetzungs flüssigkeit kann so kontrolliert ohne direkten Kontakt mit der Substratoberfläche in die strukturierte Ausnehmung in der Schutzschicht eingebracht werden.
- 15 Insbesondere kann die Endfläche der Benetzungs vorrichtung zum Aufbringen der Benetzungs flüssigkeit vollständig über das Benetzungs gebiet und von oben in Kontakt mit der Oberfläche der an das Benetzungs gebiet angrenzenden Schutzschicht gebracht werden.
- 20 In einer vorteilhaften Ausgestaltung der Erfindung ist die Endfläche der Benetzungs vorrichtung mit einer Genauigkeit ($\Delta x, \Delta y$) lateral über einer strukturierten Schutzschicht positionierbar, und die Benetzungsgebiete werden mit einer charakteristischen lateralen Ausdehnung (x_{spot}, y_{spot}) erzeugt, die um zumindest die Positioniergenauigkeit ($\Delta x, \Delta y$) kleiner ist, als die laterale Ausdehnung (x_{tip}, y_{tip}) der Endfläche der Benetzungs vorrichtung. Dadurch ist sichergestellt, dass die Abgabe eines Tropfens kontrolliert und nur über die Schutzschicht erfolgt.
- 25 Gemäß einer zweckmäßigen Weiterentwicklung der Erfindung werden modifizierte Nukleinsäure-Oligomere in wässriger Lösung als Benetzungs flüssigkeit aufgebracht. Die Nukleinsäure-Oligomere sind dabei mit einer oder mehreren

- 15 -

reaktiven Gruppen modifiziert, wobei zumindest eine reaktive Gruppe für eine direkte Reaktion mit der zu benetzenden Oberfläche des Substrats ausgelegt ist. Die Nukleinsäure-Oligomere können darüber hinaus zur nachfolgenden Visualisierung mit einem Fluorophor modifiziert sein.

5

Die Erfindung enthält auch eine Vorrichtung zur Durchführung des beschriebenen Verfahrens. Mit besonderem Vorteil enthält eine solche Vorrichtung eine Benetzungsvorrichtung, deren Endfläche mit einer Positioniergenauigkeit von weniger als 50 µm, bevorzugt von weniger als 10 µm lateral über einer strukturierten Schutzschicht positionierbar ist.

10

Die Erfindung enthält ferner ein nach einem vorbeschriebenen Verfahren herstellbares flüssigkeitsbenetztes Substrat.

15

Weitere Ausgestaltungen und Vorteile der Erfindung werden nachfolgend ausführlich beschrieben:

20

Wie oben ausgeführt, umfasst die Erfindung ein Verfahren zur kontrollierten Benetzung strukturierter Substrate mit einer Flüssigkeit mittels einer Benetzungsvorrichtung bestehend aus einer einzelnen Nadel, Kapillare, Pinzette, eines Ringes oder Stempels bzw. einer Anordnung von Nadeln, Kapillaren, Pinzetten, Ringen oder Stempeln. In der vorliegenden Erfindung können diese Benetzungsvorrichtungen Spitzen mit beliebiger lateraler Ausdehnung haben, also auch und sogar bevorzugt größer als die laterale Fläche der laserablatierten, freien Substratstellen. Die Benetzungsvorrichtung der Erfindung kommt ohne direkten Kontakt mit dem Substrat aus und kann somit als ein Pseudo-Kontakt-Verfahren bezeichnet werden.

30

Aufbringen einer Schutzschicht auf das Substrat

Erfindungsgemäß werden die Substrate mit einer Schutzschicht versehen, um

den kritischen Zeitraum zwischen der Herstellung des Substrats und der Benetzung seiner Oberfläche zu überbrücken. Die Schutzschicht verhindert in diesem Zeitraum die Anlagerung unerwünschter Verunreinigungen an der Substratoberfläche.

5

Für die Schutzschicht kann jedes beliebige Material verwendet werden, das an einer Oberfläche eine geschlossene Schicht bildet und somit die Substratoberfläche von der Umgebung trennt und zu einem späteren Zeitpunkt etwa durch Laser-Ablation an gewünschten Stellen rückstandsfrei entfernt werden kann.

10

Es versteht sich, dass mit Vorteil für ein gegebenes Substrat eine angepasste Schutzschicht gewählt wird, die in bezug auf die Haftung zwischen dem Substrat und Schutzschicht optimiert ist. Ebenso lässt sich die Schutzschicht im Hinblick auf die zu verwendende Flüssigkeit optimieren. Im Falle von wässrigen Lösungen bietet sich ein hydrophiles Schichtmaterial an, so dass die

15

Flüssigkeiten die Zuleitungskanäle der Erfindung benetzen und Luftblasen vermieden werden. Bei öligen Flüssigkeiten ist hingegen hydrophobes Material zu bevorzugen.

20

Durch die Zugabe von Detergenzien zu den verwendeten Flüssigkeiten lassen sich unabhängig vom Schichtmaterial verbesserte Benetzungen der Kanalstrukturen und damit gute Flusseigenschaften erreichen. Neben üblichen bekannten Lacken aus der Lithographie (positive und negative Photolacke) und der Leiterplatten-Technologie (Lötstopplacke) eignen sich auch organische Polymere wie Cellulose, Dextran oder Collagen bzw. selbstassemblierte Monolagen aus organischen Molekülen wie Silane oder Thiole. Auch ist es denkbar, Lacke zu verwenden, deren spezielle Bestandteile beim Trocknen des Materials an der Oberfläche vorteilhafte Funktionalisierungen für besondere Anwendungen ausbilden.

30

Die Schutzschicht kann beispielsweise durch Sprühen im Falle der Photolacke, durch Spincoating oder Physisorption im Falle der organischen Polymere oder durch Siebdruck bzw. Vorhanggießen im Falle der Lötstopplacke auf das

Substrat aufgebracht werden.

In einer bevorzugten Ausgestaltung der Erfindung werden Monolagen organischer Moleküle wie Thiole oder Silane mit variabler Kettenlänge in einem

- 5 selbstassemblierenden Prozess auf das Substrat aufgebracht. Hierfür werden die organischen Moleküle in wässrigen oder organischen Lösungsmitteln gelöst und die Lösung in Kontakt mit dem zu beschichtenden Substrat gebracht. Der Abscheidungsprozess endet in einer Monolage aus kovalent gebundenen Molekülen auf dem Substrat.

10

In einer besonders bevorzugten Ausgestaltung der Erfindung werden Thiole beispielsweise der allgemeinen Struktur HS-Spacer-R bzw. [S-Spacer-R]₂ als dichte, geordnete und passivierende Monolage auf Gold aufgebracht, wobei R beliebige Kopfgruppen wie z.B. R = CH₃, OH, CO₂H, NH₂, NH₃⁺ oder SO₃⁻ sein

- 15 können und Spacer als Begriff für beliebige molekulare Verbindungen zwischen zwei Molekülen verstanden werden soll, in der Regel Alkyl-, Alkenyl-, Alkinyl-, Heteroalkyl-, Heteroalkenyl-, Heteroalkinyl-Ketten mit Kettenlängen von 1 – 20, insbesondere 1 – 14, wobei hier die Kettenlänge die kürzeste durchgehende Verbindung zwischen den zu verbindenden Strukturen ist. Al-

- 20 ternativ können die organischen Moleküle auch mit Amin-Gruppen (H₂N-Spacer-R) anstelle der Thiol-Gruppen (SH-Spacer-R) versehen werden, die sich dann durch Chemi- oder Physisorption an Platin- oder Silizium-Oberflächen anlagern lassen. Werden die Thiol-Gruppen (SH-Spacer-R) alternativ durch Silan-Gruppen ersetzt (X₃-Si-Spacer-R, wobei beispielsweise X = H, Cl, OCH₃), so lässt sich auf oxidischen Oberflächen oder Gläsern eine kovalent gebundene Monolage produzieren.

In einer anderen bevorzugten Art der Erfindung werden auf die Substrate Schutzschichten aus von der Leiterplattentechnologie bekannten Lötstopplacken aufgebracht. Es eignen sich 2-Komponenten oder 1-Komponenten Löt-

- 30 stopplacke, die über Vorhanggießverfahren, Siebdruck oder Sprayverfahren aufgebracht werden und anschließend an der Luft oder durch UV-Bestrahlung

aushärten können. Ein Vorteil dieser Verfahrensvariante ist, dass die Dicke der Lötstopplackschicht z.B. im Vorhanggießverfahren durch die Geschwindigkeit der Substrate unter dem Lackvorhang in einem großen Bereich frei eingestellt werden kann.

5

Laser-Ablation der Schutzschicht in beliebiger Geometrie

- Unter dem Begriff "Laser-Ablation" wird im Rahmen dieser Anmeldung nicht
10 nur das partielle oder vollständige Entfernen von organischen oder anorganischen Schutzschichten, sondern auch das Entfernen von Verunreinigungen auf einem Substrat durch Einstrahlung von Laserlicht verstanden. Die Laser-Ablation wird mit Vorteil zur Entfernung oder Strukturierung der aufgebrachten Schutzschicht an gewünschten Stellen des Substrats in beliebiger Geometrie
15 eingesetzt. Dadurch ist es möglich, verschiedene, genau definierte freie Substratflächen oder Bereiche mit verjüngter Schutzschicht in unterschiedlicher Größe auf ein und demselben Substrat-Design nur durch Veränderung der Laser-Belichtung zu realisieren.
- 20 Ein weiterer Gesichtspunkt der erfindungsgemäßen Lösung ist das Aufschmelzen der Substratoberfläche bei vollständigem Entfernen der Schutzschicht mittels Laser-Ablation, das durch Einstellung der Laserintensität oder der Bestrahltdauer auf die Gegebenheiten des Substrats und der Schutzschicht erreicht werden kann. Dieses kurzfristige, oberflächennahe Aufschmelzen der Substratoberfläche schließt neben der Reduktion der Oberflächenrauhigkeit auch vorhandene Poren im Material und verbessert somit die Homogenität der freien Substratoberfläche. Außerdem werden durch die Ablation weniger Goldlagen von der Oberfläche Verunreinigungen entfernt.
- 25 Die Laser-Ablation kann durch direkte Einstrahlung des Lichts oder aber durch Einstrahlung des Lichts über eine Optik bzw. eine Maske erfolgen. Die Größe oder die Form der einzelnen freizulegenden oder strukturierten Benetzungs-
- 30

- 19 -

gebiete und ihr lateraler Abstand sind hierbei beliebig und nur von der jeweiligen Anwendung abhängig. Die Wellenlänge des verwendeten Laserlichts, sowie Einstrahldauer bzw. Anzahl und Dauer der Pulse hängen von der Kombination aus Schutzschicht und des Materials der Substratoberfläche ab und
5 werden vorzugsweise für jedes Paar optimiert.

In einer bevorzugten Variante der Erfindung wird mit einem Excimer-Laser über eine Blende eine Anordnung von freien Benetzungsgebieten mit einem Durchmesser von je $d = 10 - 100 \mu\text{m}$ und einem lateralen Abstand von 50 -
10 200 μm in eine monomolekulare Schicht aus Octadecanthiol gebrannt.

In einer anderen bevorzugten Variante der Erfindung werden mit einem Excimer-Laser über mehrere Masken in mehreren Prozessschritten Strukturen aus Kanälen und freien Benetzungsgebieten in einen Lötstopplack geschrieben,
15 die neben der kontrollierten Benetzung an den freien Substratstellen mittels des beschriebenen Pseudo-Kontakt-Druckverfahrens auch das gezielte Kontaktieren von über Kanälen miteinander verbundenen Stellen mit einer einen Analyten enthaltenden Flüssigkeit ermöglichen. In Lötstopplackschichten von 100 – 150 μm Dicke werden mit einer bestimmten Anzahl an Laser-Pulsen
20 verschiedene Kanäle der Tiefe 80 – 100 μm und der Breite 10 – 150 μm geschnitten und dann innerhalb der Kanäle das Substrat an mehreren Stellen mit Durchmessern von etwa $d = 10 - 100 \mu\text{m}$ durch weitere Laser-Pulse freigelegt. Durch solche in den Kanalstrukturen freigelegten, sensiblen Substratstellen wird die für eine Analyse benötigte Analytflüssigkeit im Vergleich zur Benutzung des gesamten Substrates deutlich verringert.
25

Benetzung der strukturierten Substrate mit einer Flüssigkeit im Pseudo-Kontakt-Drucken

Nach der Erfindung wird die Benetzungsflüssigkeit insbesondere mit Hilfe einer Nadel, Kapillare, Pinzette, eines Ringes oder Stempels bzw. einer Anord-

- 20 -

nung von Nadeln, Kapillaren, Pinzetten, Ringen oder Stempeln auf das strukturierte Substrat aufgebracht. In der vorliegenden Anmeldung wird die Bezeichnung „Pseudo-Kontakt-Drucken“ für den Benetzungsvorgang verwendet, um die Technik vom bekannten Standardverfahren des „Contact Printings“ abzuheben und deutlich zu machen, dass wegen der vorhandenen Schutzschicht und der lateralen Ausdehnung der Spitzen der Benetzungsvorrichtung, welche bevorzugt größer als die freien zu benetzenden Flächen ist, kein direkter Kontakt zwischen der Benetzungsvorrichtung und der Substratoberfläche zustande kommt. Da zusätzlich die freie, zu benetzende Substratfläche von der Schutzschicht einer vorbestimmten Höhe begrenzt ist, trifft die Benetzungsvorrichtung auf eine geometrische Barriere definierter Abmessung, so dass eine kontrollierte Benetzung zustande kommt.

Im Rahmen der Erfindung lassen sich sowohl reine flüssige Stoffe, als auch jede Art von gelösten organischen oder anorganischen Stoffen, sowie Emulsionen, Suspensionen und kolloidale Lösungen verwenden. Denkbare Materialien im Sinne der Erfindung sind gelöste Farbpigmente oder beliebige funktionalisierte Polymere und Nanopartikel. Auf dem Gebiet der Sensorik lassen sich mit der vorliegenden Erfindung alle Arten von Ligaten auf das Substrat aufbringen. Als Ligaten werden Moleküle bezeichnet, die spezifisch mit einem Liganden unter Ausbildung eines Komplexes wechselwirken. Beispiele von Ligaten im Sinne der vorliegenden Schrift sind Substrate, Cofaktoren oder Coenzyme als Komplexbindungspartner eines Proteins (Enzyms), Antikörper (als Komplexbindungspartner eines Antigens), Antigene (als Komplexbindungspartner eines Antikörpers), Rezeptoren (als Komplexbindungspartner eines Hormons), Hormone (als Komplexbindungspartner eines Rezeptors), Nukleinsäure-Oligomere (als Komplexbindungspartner des komplementären Nukleinsäure-Oligomers) oder Metallkomplexe.

In einer bevorzugten Art der Erfindung werden die freien Substratstellen mit modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren in wässriger Lösung benetzt. Das Nukleinsäure-Oligomer, das auf die freie Oberfläche aufgebracht werden soll, ist

- 21 -

über einen kovalent angebundenen Spacer beliebiger Zusammensetzung und Kettenlänge mit einer oder mehreren reaktiven Gruppe modifiziert, wobei sich diese reaktiven Gruppen bevorzugt in der Nähe eines Endes des Nukleinsäure-Oligomers befinden. Bei den reaktiven Gruppen handelt es sich um Gruppen, die direkt mit der unmodifizierten Oberfläche reagieren können. Beispiele hierfür sind: (i) Thiol- (HS-) oder Disulfid- (S-S-) derivatisierte Nukleinsäure-Oligomere der allgemeinen Formel ($n \times HS\text{-Spacer}$)-oligo, ($n \times R\text{-S-S-Spacer}$)-oligo oder oligo-Spacer-S-S-Spacer-oligo, die mit einer Goldoberfläche unter Ausbildung von Gold-Schwefelbindungen reagieren, (ii) Amine, die sich durch Chemi- oder Physisorption an Platin- oder Silizium-Oberflächen anlagern und (iii) Silane, die mit oxidischen Oberflächen eine kovalente Bindung eingehen.

Im Pseudo-Kontakt-Drucken wird der Dispenser der Benetzungsanordnung mit beliebiger lateraler Ausdehnung (x_{tip} , y_{tip}) mit einer Genauigkeit von (Δx , Δy) über dem strukturierten Schutzfilm positioniert und für die Benetzung so weit herabgesenkt, dass der Kontakt der Benetzungsanordnung bei der Abgabe des Tropfens nur über die Schutzschicht erfolgt. Dies ist insbesondere dann gewährleistet, wenn die Benetzungsgebiete eine charakteristische laterale Ausdehnung (x_{spot} , y_{spot}) aufweisen, die um zumindest die Positioniergenauigkeit kleiner als die Ausdehnung des Dispensers ist, also die Bedingungen

$$x_{spot} \leq x_{tip} - \Delta x \quad \text{und} \quad y_{spot} \leq y_{tip} - \Delta y$$

erfüllt sind.

25

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

30 Nachfolgend soll die Erfindung anhand von Ausführungsbeispielen im Zusammenhang mit den Zeichnungen näher erläutert werden. Dabei sind nur die für das Verständnis der Erfindung wesentlichen Elemente dargestellt. Es zeigt

- Fig. 1 in (a) bis (e) eine schematische Darstellung der Prozessführung beim Benetzen eines Substrats mit einer Flüssigkeit nach einem Ausführungsbeispiel der Erfindung;
- Fig. 2 in (a) und (b) SEM-Aufnahmen von durch Laser-Ablation freigelegten Benetzungsstellen in einer Stopplack-Schutzschicht;
- Fig. 3 in (a) ein AFM-Bild einer gelaserten und aufgeschmolzenen Gold-Oberfläche und in (b) ein Querschnitts-Höhenprofil entlang der Linie B-B aus Fig. 3(a); und
- Fig. 4 die Schwankungen der Fluoreszenzintensität bei einer Mehrzahl identischer Messspots als Maß für die Oberflächenbelegungsdichte mit Nukleinsäureoligomeren, (a) bei auf herkömmliche Weise gespotteten Nukleinsäure-Oligomeren und (b) bei Benetzung von Benetzungsgebieten auf der Substratoberfläche durch ein erfindungsgemäßes Verfahren.

Wege zur Ausführung der Erfindung

5

Ein Verfahren zum Benetzen eines Substrats mit einer Flüssigkeit nach einem Ausführungsbeispiel der Erfindung wird nachfolgend insbesondere mit Bezug auf Fig. 1 beschrieben.

- 10 In einem ersten Schritt wird ein Substrat 10 mit einer zu benetzenden Oberfläche 12 bereitgestellt, Fig. 1(a). Im Ausführungsbeispiel besteht das Substrat 10 aus einem Glas-Slide mit einer aufgedampften, 5 nm dicken CrNi-Kontaktschicht und einer darauf aufgedampften Goldschicht mit einer Dicke von etwa 200 nm.

15

- 23 -

Vor der Belegung mit einer Schutzschicht wird das Substrat mit einer Standard Piranha-Reinigung ($t = 30$ s) behandelt. Zum Aufbringen einer C18-Schutzschicht 14 auf die Goldoberfläche wird das Substrat 10 bei Zimmertemperatur für 5 - 12 Stunden mit 1 nmol/l Octadecanthiol (C-18; Fluka) in Ethanol inkubiert und nach der Inkubation mit Ethanol gespült, um nicht angebundenes Thiol zu entfernen, Fig. 1(b).

Anschließend wird der C18-Schutzfilm 14 durch Laser-Ablation strukturiert, um eine Mehrzahl von Benetzungsgebieten 16 auszubilden, wie in Fig. 1(c) illustriert. Beispielsweise wird die Strukturierung des C18-Schutzfilms mit Strahlung 18 einer Wellenlänge von 193 nm eines Excimer-Lasers 20 der Firma Lambda-Physics durchgeführt. Mit 3 Pulsen à 20 ns mit einer Flächenleistung von 100 mJ/cm² lassen sich die Thiole der Schutzschicht 14 in den Benetzungsgebieten 16 rückstandsfrei entfernen.

- 15 Der Laserbeschuss des Substrats 10 führt darüber hinaus zu einem Aufschmelzen der Goldoberfläche, wodurch Poren geschlossen, die Rauigkeit reduziert und Verunreinigungen entfernt werden (Fig. 3).
- 20 Die Laserstrahlung wird über eine nicht gezeigte Maske verkleinert auf dem Substrat abgebildet, welche im Ausführungsbeispiel Beleuchtungsspots mit einem Durchmesser von 40-100 µm liefert. Die Benetzungsgebiete werden mit einem lateralen Abstand von beispielsweise 200 µm in die Schutzschicht gebrannt.
- 25 Figur 2 zeigt SEM-Aufnahmen von durch Laser-Ablation freigelegten Benetzungsgebieten 16 in einer Schutzschicht 14. Für diese SEM-Aufnahmen wurde anstelle der C18-Schutzschicht der Fig. 1 eine Stopplack-Schutzschicht verwendet. Da zu wird auf das Substrat ein 2-Komponenten Lötstopplack (Eipemer GL 2467 SM-DG, Fa. Peters) in einem aus der Leiterplatten-Technologie bekannten Vorhanggieß-Verfahren aufgebracht, um eine Schutzschicht für die Oberfläche des Substrats zu bilden. Durch die Variation der

- 24 -

Transportgeschwindigkeit des Substrats 10 unter dem Lack-Vorhang lassen sich beliebige Dicken der Schutzschicht im Bereich von etwa 10 – 150 µm erzielen.

- 5 Nach dem Trocknen des Lackes wird die Schutzschicht mit einem Excimer-Laser der Firma Lambda-Physics durch Laserablation strukturiert. Im Fall von Schutzschichten einer Dicke von 15 – 20 µm entfernen 90 – 150 Pulse à 20 ns mit einer Flächenleistung von 600 – 1200 mJ/cm² den Lack rückstandsfrei und sorgen für ein oberflächennahes Aufschmelzen der Goldsubstrate, das vorhandene Poren schließt, die Rauigkeit reduziert und Oberflächenverunreinigungen beseitigt. Der Laser kann über verschiedene Masken verkleinert auf dem Substrat abgebildet werden, wobei die Flächenintensität der Bestrahlung über die Abbildungsvorrichtung eingestellt wird. Je nach Maske lassen sich so verschiedene Geometrie der ablatierten Regionen realisieren.
- 10
- 15 Die Figur 2 illustriert, dass sowohl rechteckige bzw. quadratische Querschnitte (Fig. 2(a)), als auch runde Querschnitte, wie in Fig. 2(b) dargestellt, möglich sind.
- 20 Die mit dem Aufschmelzen der Gold-Oberfläche des Substrats 10 verbundene Verbesserung der Oberflächenstruktur ist in Fig. 3 illustriert. Figur 3 zeigt in (a) eine AFM-Aufnahme einer Gold-Oberfläche, die in einem kreisförmigen Teilbereich durch Laserbeschuss aufgeschmolzen wurde, und in Fig. 3(b) ein Höhenprofil entlang der Linie B-B von Fig. 3(a). Es ist deutlich zu erkennen, dass durch das Aufschmelzen die Rauigkeit der Oberfläche verringert und die Homogenität der bestrahlten Fläche erhöht wird. Dies erleichtert die nachfolgend beschriebene Anbindung von Sondenmolekülen an die Benetzungsgebiete 16.
- 25
- 30 Zurückkehrend zu Fig. 1 zeigt Fig. 1(d) die Benetzung der strukturierten Substrate mittels einer Benetzungsvorrichtung 22 mit Nukleinsäure-Oligomeren im Pseudo-Kontakt-Druckverfahren.

- Die Synthese der Oligonukleotide erfolgt in einem automatischen Oligonukleotid-Synthesizer (Expedite 8909; ABI 384 DNA/RNA-Synthesizer) gemäß der vom Hersteller empfohlenen Syntheseprotokolle für eine 1.0 µmol Synthese.
- 5 Bei den Synthesen mit dem 1-O-Dimethoxytrityl-propyl-disulfid-CPG-Träger (Glen Research 20-2933) werden die Oxidationsschritte mit einer 0.02 molaren Iodlösung durchgeführt, um eine oxidative Spaltung der Disulfidbrücke zu vermeiden. Modifikationen an der 5'-Position der Oligonukleotide erfolgen mit einem auf 5 min verlängerten Kopplungsschritt. Der Amino-Modifier C2 dT
- 10 (Glen Research 10-1037) wird in die Sequenzen mit den jeweiligen Standardprotokoll eingebaut. Die Kopplungseffizienzen werden während der Synthese online über die DMT-Kationen-Konzentration photometrisch bzw. konduktometrisch bestimmt.
- 15 Die Oligonukleotide werden mit konzentriertem Ammoniak (30%) bei 37 °C 16 h entschützt. Die Reinigung der Oligonukleotide erfolgt mittels RP-HPL Chromatographie nach Standardprotokollen (Laufmittel: 0,1 molarer Triethylammoniumacetat-Puffer, Acetonitril), die Charakterisierung mittels MALDI-TOF MS. Die aminmodifizierten Oligonukleotide werden an die entsprechenden aktivierten Fluorophore (z. B. Fluoresceinisothiocyanat) entsprechend der dem Fachmann bekannten Bedingungen gekoppelt. Die Kopplung kann sowohl vor als auch nach der Anbindung der Oligonukleotide an die Oberfläche erfolgen.
- 20 Auf das strukturierte Substrat 10 wird doppelt modifiziertes 20 bp Einzelstrang-Oligonukleotid der Sequenz 5'-AGC GGA TAA CAC AGT CAC CT-3' (Modifikation eins: die Phosphatgruppe des 3' Endes ist mit (HO-(CH₂)₂-S)₂ zum P-O-(CH₂)₂-S-S-(CH₂)₂-OH verestert ist, Modifikation zwei: an das 5' Ende ist der Flourescein-Modifier Flourescein-Phosphoramidite (Progio Biochemie GmbH)
- 25 nach dem jeweiligen Standardprotokoll eingebaut) als 5x10⁻⁵ molare Lösung in Puffer (Phosphatpuffer, 0,5 molar in Wasser, pH 7) mit Zusatz von ca. 10⁻⁵ bis 10⁻¹ molarem Propanthiol (oder anderen Thiolen oder Disulfiden geeigneter

Kettenlänge) mit Hilfe eines Spotters (Cartesian) aufgebracht (Fig. 1(d)) und für 2 min -24h inkubiert. Während dieser Reaktionszeit wird der Disulfidspacer P-O-(CH₂)₂-S-S-(CH₂)₂-OH des Oligonukleotids homolytisch gespalten. Dabei bildet der Spacer mit Au-Atomen der Oberfläche eine kovalente Au-S Bindung aus, wodurch es zu einer 1:1 Koadsorption des ss-Oligonukleotids und des abgespaltenen 2-Hydroxy-mercaptoethanols kommt. Das in der Inkubationslösung gleichzeitig anwesende, freie Propanthiol wird ebenfalls durch Ausbildung einer Au-S Bindung koadsorbiert (Inkubationsschritt). Statt des Einzelstrang-Oligonukleotids kann dieser Einzelstrang auch mit seinem Komplementärstrang hybridisiert sein.

Für die Belegung mit dem Spotter der Firma Cartesian Technologies (Micro-Sys PA) werden Split-Pin Nadeln 22 (ArrayIt Chipmarker Pins der Firma TeleChem) verwendet, die ein Ladevolumen 24 von 0.2 bis 0.6 µL haben und Vo-15 lumenia 26 von etwa 1 nL pro Benetzungsvorgang abgeben. Eine Seitenansicht der Nadel 22 beim Benetzungsvorgang und ein benetztes Benetzungsgebiet 16 ist in der Fig. 1(e) dargestellt.

Die Kontaktfläche 28 der Nadeln 22 hat einen Durchmesser von etwa 130 µm 20 und ist damit deutlich größer als die bei der Laser-Ablation freigelegten Benetzungsgebiete 16 des Substrates. Die Positionierung der Nadel über dem Substrat erfolgt mit einer Genauigkeit von 10 µm bei einer Luftfeuchtigkeit von etwa 70-80 %. Der Tropfen 26 wird beim Kontakt der Spitze mit der Schutzschicht 14 abgegeben und es kommt zu keiner direkten Berührung der Nadel 25 22 mit der zu benetzenden Oberfläche 12 des Substrats 10. Diese Situation ist im linken Teilbild der Fig. 1(e) gezeigt. Nach erfolgter Benetzung ist ein Flüssigkeitstropfen 30 auf der Benetzungsstelle 16 des Substrats kontrolliert aufgebracht (rechtes Teilbild der Fig. 1(e)).

30 Als Anwendungsbeispiel wird nunmehr eine Fluoreszenz-Intensitätsmessung am System Au-ss-Oligo-Fluorescein beschreiben. Dazu werden wie oben beschrieben, Benetzungsgebiete 16 auf einem strukturierten Substrat 10 mit

Nukleinsäure-Oligomeren funktionalisiert. Dazu wird ein modifiziertes Oligonukleotid der Sequenz 5'-Fluorescein-AGC GGA TAA CAC AGT CAC CT-3' [C_3 -S-S- C_3 -OH] auf Gold immobilisiert (50 μ mol Oligonukleotid in Phosphat-Puffer (K_2HPO_4/KH_2PO_4 500 mmolar, pH 7), Nachbelegung mit Propanthiol 1 mM in Wasser) und in der Form *Au-S(CH₂)₂-ss-oligo-Fluorescein* die Fluoreszenzintensität der Oberfläche mit einem Fluoreszenz-Scanner der Firma Livation Biotech bestimmt. Zur Messung der Fluoreszenz in Gegenwart von flüssigen Medien werden 150 μ l des Mediums auf die Goldoberfläche gegeben und anschließend mit einem Deckglas abgedeckt. Alternativ können auch Hybridwells oder eine Imaging Chamber verwendet werden.

Figur 4 zeigt die Schwankungen der Fluoreszenzintensität mehrerer identischer Messspots. Die laufende Nummer der Messspots ist auf der Abszisse aufgetragen, die in beliebigen Einheiten gemessene Fluoreszenzintensität auf der Ordinate. Bei den Messwerten der Fig. 4(a) sind die Nukleinsäure-Oligomere auf herkömmliche Weise gespottet, bei den Werten der Fig. 4(b) erfolgte die Benetzung durch das oben beschriebenen Pseudo-Kontakt-Druckverfahren der Erfindung. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Schwankungen der Fluoreszenzintensitäten von Messspot zu Messspot durch die erfundungsgemäßen Maßnahmen gegenüber dem Stand der Technik signifikant reduziert werden.

In einem weiteren Ausführungsbeispiel wird ein Lötstopplack als Schutzschicht verwendet und zur Erzeugung von Benetzungsgebieten mit Zuleitungen für flüssige Analyten strukturiert. Mit Hilfe der Laser-Ablation von Lötstopplack-Schutzschichten lassen sich neben den einzelnen Benetzungsgebieten auch Zuleitungskanäle für Flüssigkeiten in dicke Lötstopplackschichten (beispielsweise 100 – 150 μ m) schreiben.

In einem ersten Strukturierungsschritt werden hierbei über eine erste Maske verschiedene Arten von Kanälen in den Lack geschnitten, wobei sich die Tiefe dieser Kanäle durch die Anzahl der Pulse einstellen lässt. Eine Kanaltiefe von

- etwa 80 – 120 µm wird mit etwa 540 – 900 Pulsen (20 ns) des Lasers mit einer Flächenleistung von 600 – 1200 mJ/cm² erreicht. In einem zweiten Strukturierungsschritt werden dann über eine zweite Maske in einzelnen Bereichen innerhalb der Kanäle des ersten Strukturierungsschrittes durch zusätzliche Laser-Belichtung mit etwa 90 – 150 Pulsen (20 ns) der restliche Lack entfernt, und so das Substrat freigelegt und aufgeschmolzen. Diese freigelegten Substratstellen werden nun wie oben beschrieben mit Nukleinsäure-Oligomeren benetzt.
- 5
- 10 Auf einem oben beschriebenen Substrat können mehrere jeweils über einen der Kanäle im Lötstopplack verbundene Benetzungsgebiete gezielt mit einem Analyten, wie z.B. Flüssigkeiten die potentiell komplementäre Nukleinsäure-Oligomere enthalten in Kontakt gebracht werden, und somit die für eine Analyse benötigte Analytflüssigkeit deutlich reduziert werden.
- 15 Eine Kanalstruktur, die z.B. pro Kanal jeweils nur einen Teil der freigelegten Substratstellen verbindet ist eine Anordnung von n linearen Kanälen, die jeweils alle m Benetzungsgebiete einer Spalte einer gleichmäßigen Spot-Matrix der Dimension n x m enthalten, wobei zweckmäßig 10 ≤ n, m ≤ 1000 ist. Eine 20 andere Kanalstruktur, die alle freigelegten Substratstellen miteinander verbindet ist ein einzelner Kanal, der mäanderförmig alle freigelegten Substratstellen der gleichmäßigen Benetzungsgebiete-Matrix der Dimension n x m verbindet, wobei zweckmäßig 10 ≤ n, m ≤ 1000 ist.

Patentansprüche

- 5 1. Verfahren zum Benetzen eines Substrats mit einer Flüssigkeit, mit den Verfahrensschritten
 - a) Bereitstellen eines Substrats mit einer zu benetzenden Oberfläche;
- 10 b) Bereitstellen einer Benetzungsflüssigkeit;
- c) Aufbringen einer Schutzschicht auf das Substrat, die die zu benetzende Oberfläche von der Umgebung trennt;
- 15 d) Strukturieren der Schutzschicht, um vorbestimmte Benetzungsgebiete auf der zu benetzenden Oberfläche des Substrats freizulegen; und
- e) Aufbringen der Benetzungsflüssigkeit auf die freigelegten Benetzungsgebiete mittels einer Benetzungsvorrichtung ohne direkten Kontakt zwischen der Benetzungsvorrichtung und der zu benetzenden Oberfläche des Substrats.
- 20
2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, dass
- 25 als Substrat ein Festkörper aus Kunststoff, Metall, Halbleiter, Glas, Verbundstoff, porösem Material oder aus einer Kombination dieser Materialien bereitgestellt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet, dass
- 30

- 30 -

als Substrat ein Festkörper bereitgestellt wird, dessen zu benetzende Oberfläche durch eine Siliziumschicht, eine Platinschicht, eine Goldschicht, durch eine oxidische Oberfläche oder ein Glas gebildet ist.

- 5 4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass
als Substrat eine makroskopische Festkörperscheibe, ein Mikro- oder Nanopartikel bereitgestellt wird.
- 10 5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass
als Benetzungsflüssigkeit ein rein flüssiger Stoff, eine Lösung organischer und/oder anorganischer Stoffe, eine Emulsion, eine Suspension oder eine kolloidale Lösung bereitgestellt wird.
- 15 6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass
das Material der Schutzschicht so auf das Substratmaterial abgestimmt wird, dass das Schutzschichtmaterial auf der zu benetzenden Substratoberfläche physisorbiert, chemisorbiert oder kovalent, koordinativ oder über Komplexbildung gebunden wird.
- 20 7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass
als Schutzschicht ein positiver oder negativer Photolack auf das Substrat aufgebracht, bevorzugt aufgesprührt oder aufgeschleudert wird.
- 25 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6,
dadurch gekennzeichnet, dass
als Schutzschicht ein Lötstopplack auf das Substrat aufgebracht wird, bevorzugt, dass der Lötstopplack durch Siebdruck, Vorhanggießen oder ein Sprayverfahren aufgebracht wird.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6,
dadurch gekennzeichnet, dass
als Schutzschicht ein organisches Polymer, insbesondere aus Cellulose,
5 Dextran oder Collagen auf das Substrat aufgebracht wird, bevorzugt, dass
das organische Polymer aufgeschleudert oder durch Physisorption aufge-
bracht wird.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6,
10 dadurch gekennzeichnet, dass
als Schutzschicht eine selbstassemblierte Monolage aus organischen Mo-
lekülen aufgebracht wird.
11. Verfahren nach Anspruch 10,
15 dadurch gekennzeichnet, dass
die selbstassemblierte Monolage aufgebracht wird, indem die organischen
Moleküle in einem wässrigen oder organischen Lösungsmittel gelöst wer-
den und die Lösung in Kontakt mit dem Substrat gebracht wird.
- 20 12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11,
dadurch gekennzeichnet, dass
 - als Substrat ein Festkörper bereitgestellt wird, dessen zu benetzende
Oberfläche durch eine Goldschicht gebildet ist, und dass
 - als Schutzschicht eine selbstassemblierte Monolage aus Thiolen, insbe-
sondere der allgemeinen Struktur HS-Spacer-R oder [S-Spacer-R]₂ aufge-
bracht wird, wobei R eine beliebige Kopfgruppe ist und der Spacer eine
Kettenlänge von 1 – 20, insbesondere 1 – 14 hat.
- 30 13. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11,
dadurch gekennzeichnet, dass
 - als Substrat ein Festkörper bereitgestellt wird, dessen zu benetzende
Oberfläche durch eine Silizium- oder Platinschicht gebildet ist, und dass

- als Schutzschicht eine selbstassemblierte Monolage aus Aminen, insbesondere der allgemeinen Struktur H₂N-Spacer-R aufgebracht wird, wobei R eine beliebige Kopfgruppe ist und der Spacer eine Kettenlänge von 1 – 20, insbesondere 1 – 14 hat.

5

14. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11,

dadurch gekennzeichnet, dass

- als Substrat ein Festkörper bereitgestellt wird, dessen zu benetzende Oberfläche durch eine oxidische Oberfläche oder ein Glas gebildet ist, und

10

dass

- als Schutzschicht eine selbstassemblierte Monolage aus Silanen, insbesondere der allgemeinen Struktur X₃-Si-Spacer-R aufgebracht wird, wobei R eine beliebige Kopfgruppe und X = H, Cl oder OCH₃ ist und der Spacer eine Kettenlänge von 1 – 20, insbesondere 1 – 14 hat.

15

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 14,

dadurch gekennzeichnet, dass

R = CH₃, OH, CO₂H, NH₂, NH₃⁺ oder SO₃⁻ ist.

20

16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet, dass

die Schutzschicht in Schritt c) in Form einer geschlossenen Schicht auf die zu benetzenden Substratoberfläche aufgebracht wird.

25

17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet, dass

die Schutzschicht vollflächig auf die zu benetzende Oberfläche des Substrats aufgebracht wird.

30

18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet, dass

die Schutzschicht mittels Laserablation, insbesondere durch Bestrahlung von Teilbereichen der Schutzschicht mit kontinuierlicher oder gepulster Laserstrahlung einer vorbestimmten Wellenlänge strukturiert wird.

- 5 19.Verfahren nach Anspruch 18,
dadurch gekennzeichnet, dass
die Schutzschicht direkt, über eine Optik oder über eine Maske mit der Laserstrahlung beaufschlagt wird, um die Benetzungsgebiete freizulegen.
- 10 20.Verfahren nach Anspruch 18 oder 19,
dadurch gekennzeichnet, dass
durch die Laserstrahlung die zu benetzende Oberfläche des Substrats im Bereich der Benetzungsgebiete aufgeschmolzen wird.
- 15 21.Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass
die Schutzschicht im Bereich der Benetzungsgebiete rückstandslos entfernt wird.
- 20 22.Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass
die Benetzungsgebiete mit einer charakteristischen Ausdehnung von etwa 5 µm bis etwa 200 µm, bevorzugt von etwa 10 µm bis etwa 100 µm erzeugt werden.
- 25 23.Verfahren nach Anspruch 22,
dadurch gekennzeichnet, dass
die Benetzungsgebiete in einem lateralen Abstand von etwa 20 µm bis etwa 500 µm, bevorzugt von etwa 50 µm bis etwa 200 µm erzeugt werden.
- 30 24.Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass

- 34 -

die Benetzungsgebiete mit im Wesentlichen rechteckigem, elliptischem oder kreisförmigem Umriss erzeugt werden.

25.Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,

5 **dadurch gekennzeichnet, dass**

bei dem Schritt des Strukturierens der Schutzschicht Zuleitungskanäle in die Schutzschicht eingebracht werden, um die Zuführung einer Analytflüssigkeit zu den freigelegten Benetzungsgebieten zu ermöglichen.

10 26.Verfahren nach Anspruch 25,

dadurch gekennzeichnet, dass

die Zuleitungskanäle mit einer Tiefe von 10% bis 99%, bevorzugt von 20% bis 95%, besonders bevorzugt von 50% bis 95% der Dicke der Schutzschicht in die Schutzschicht eingebracht werden.

15

27.Verfahren nach Anspruch 25 oder 26,

dadurch gekennzeichnet, dass

die freigelegten Benetzungsgebiete innerhalb der Zuleitungskanäle angeordnet sind.

20

28.Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet, dass

die Benetzungsvorrichtung eine einzelne Nadel, Kapillare, Pinzette, einen einzelnen Ring oder Stempel umfasst.

25

29.Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet, dass

die Benetzungsvorrichtung eine Anordnung mehrerer Nadeln, Kapillaren, Pinzetten, Ringen, Stempeln, oder eine Anordnung verschiedener dieser

30

Elemente umfasst.

30. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass
die Benetzungsvorrichtung eine flüssigkeitsabgebende Endfläche aufweist,
deren laterale Ausdehnung in zumindest einer Raumrichtung größer ist, als
5 die laterale Ausdehnung der Benetzungsgebiete in dieser Raumrichtung.
31. Verfahren nach Anspruch 30,
dadurch gekennzeichnet, dass
die Endfläche der Benetzungsvorrichtung in beiden Raumrichtungen eine
10 größere laterale Ausdehnung aufweist als die Benetzungsgebiete.
32. Verfahren nach Anspruch 30 oder 31,
dadurch gekennzeichnet, dass
zum Aufbringen der Benetzungsflüssigkeit die Endfläche der Benetzungsvorrichtung an einem Benetzungsgebiet in Kontakt mit der an das Benetzungsgebiet angrenzenden Schutzschicht gebracht wird.
15
33. Verfahren nach einem der Ansprüche 30 bis 32,
dadurch gekennzeichnet, dass
zum Aufbringen der Benetzungsflüssigkeit die Endfläche der Benetzungsvorrichtung vollständig über das Benetzungsgebiet und von oben in Kontakt mit der Oberfläche der an das Benetzungsgebiet angrenzenden Schutzschicht gebracht wird.
20
- 25 34. Verfahren nach einem Ansprache 30 bis 33,
dadurch gekennzeichnet, dass
die Endfläche der Benetzungsvorrichtung mit einer Genauigkeit ($\Delta x, \Delta y$) lateral über einer strukturierten Schutzschicht positionierbar ist, und die Benetzungsgebiete mit einer charakteristischen lateralen Ausdehnung (x_{spot}, y_{spot}) erzeugt werden, die um zumindest die Positioniergenauigkeit ($\Delta x, \Delta y$) kleiner ist, als die laterale Ausdehnung (x_{tip}, y_{tip}) der Endfläche der Benetzungsvorrichtung.
30

- 36 -

35.Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet, dass

als Benetzungsflüssigkeit modifizierte Nukleinsäure-Oligomere in wässriger

5 Lösung aufgebracht werden, wobei die Nukleinsäure-Oligomere mit einer oder mehreren reaktiven Gruppen modifiziert sind und zumindest eine reaktive Gruppe für eine direkte Reaktion mit der zu benetzenden Oberfläche des Substrats ausgelegt ist.

10 36.Verfahren nach Anspruch 35,

dadurch gekennzeichnet, dass

die Nukleinsäure-Oligomere mit einem Fluorophor modifiziert sind.

37.Verfahren nach Anspruch 35 oder 36,

15 **dadurch gekennzeichnet, dass**

die Nukleinsäure-Oligomere in wässriger Lösung mit einem Detergenz aufgebracht werden.

20 38.Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach einem der vorhergehenden Ansprüche.

25 39.Vorrichtung nach Anspruch 38, mit einer Benetzungsvorrichtung, deren Endfläche mit einer Positioniergenauigkeit von weniger als 50 µm, bevorzugt von weniger als 10 µm lateral über einer strukturierten Schutzschicht positionierbar ist.

40.Flüssigkeitsbenetztes Substrat, herstellbar nach einem der Ansprüche 1 bis

37.

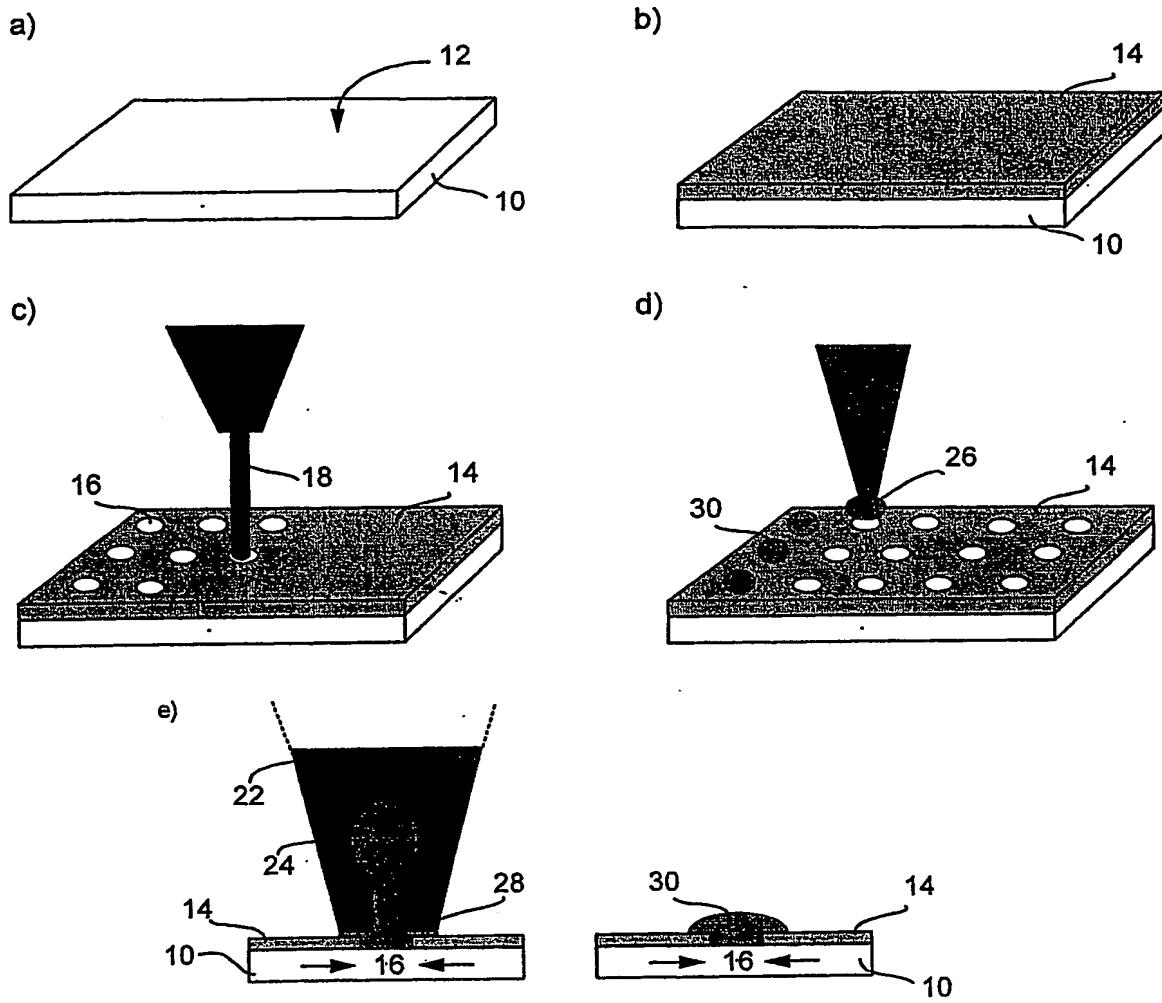


Fig. 1

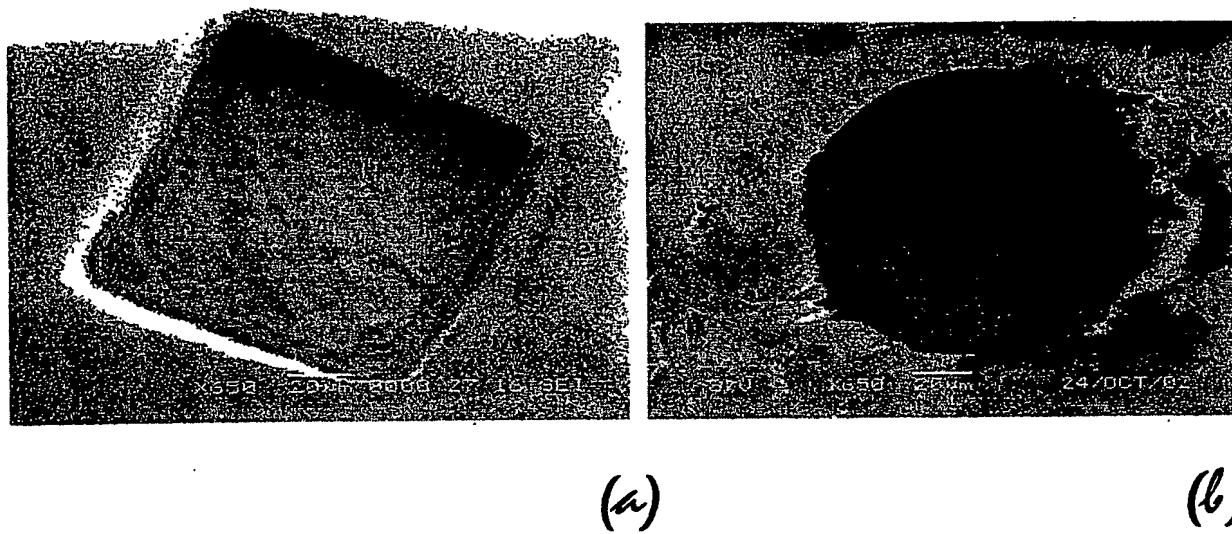
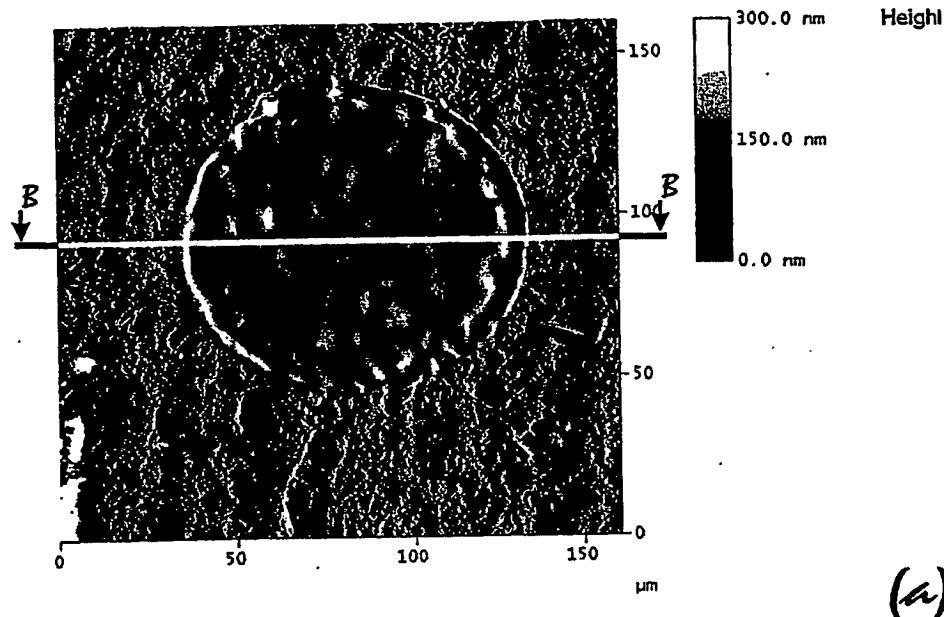
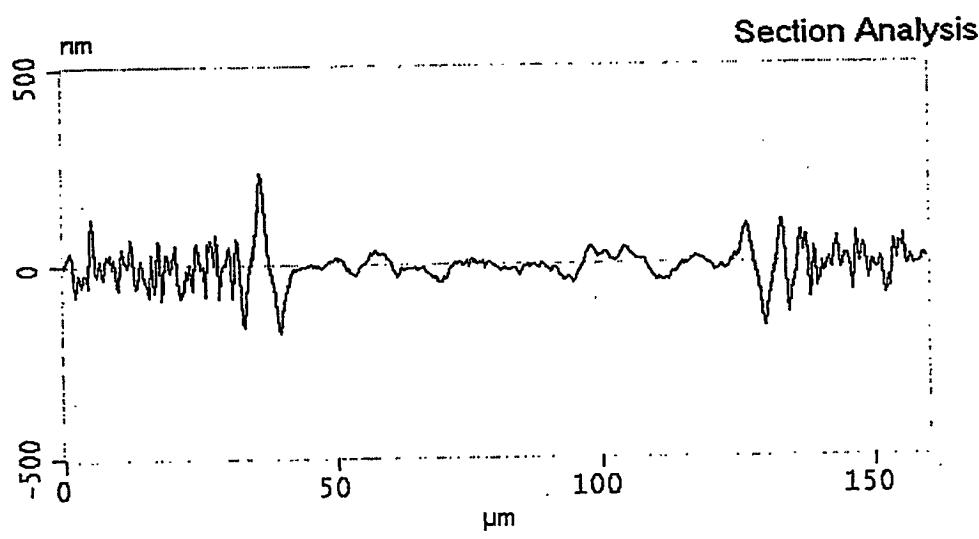


Fig. 2

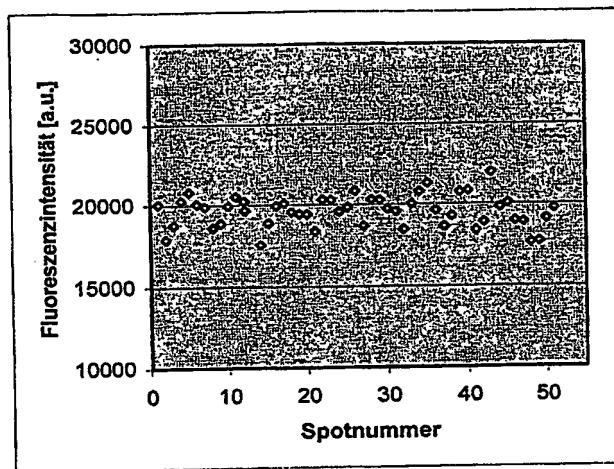
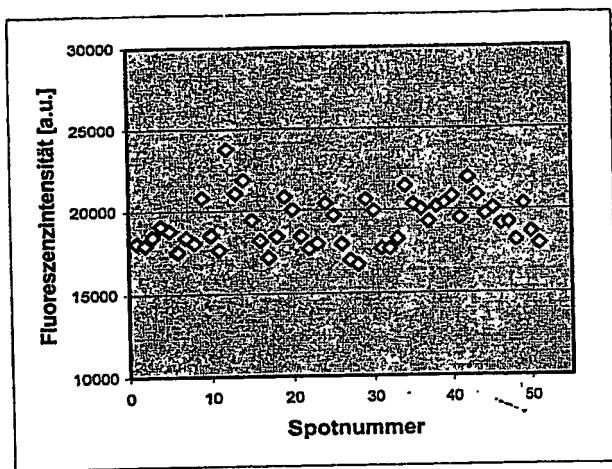


(a)



(b)

Fig. 3



(a)

(b)

Fig. 4